

โอลิโกแซคคาไรด์จากแกลบข้าวหอมมะลิที่ผลิตโดยเอนไซม์ไซแลนเนสกลุ่มไกลโคไซด์ไฮโดรเลส
10 และ 11 และผลต่อการส่งเสริมการเจริญของเชื้อแลคโตบาซิลลัสพีซีส์
Oligosaccharides from Hommali Rice Husk Produced by Glycoside Hydrolase
Family 10 and 11 Xylanases and their Effects on Growth Promotion of
Lactobacillus spp.

อลิษา ภัทรพิสิทธิ์พร¹, ปณณปภณ ใจฉกรรจ์¹, พฤติ บรรจงกาลกุล¹ และ วรณพร คลังเพชร^{1*}

Alisa Pattarapisitporn¹, Pannapapol Jaichaka, Pruetthi Bunjongkalkul¹ and Wannaporn Klangpetch^{1*}

¹ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร 99 หมู่ 9 ตำบลท่าโพธิ์ อำเภอเมือง
จังหวัด พิษณุโลก 65000

¹Department of Agro-Industry, Faculty of Agriculture, Natural Resources and Environment, Naresuan University 99 Moo 9,
Thapho, Muang, Phitsanulok 65000

*Corresponding author: wannapornk@nu.ac.th

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของเอนไซม์ไซแลนเนสกลุ่มไกลโคไซด์ไฮโดรเลส 10 (GH10) และ 11 (GH11) ต่อการผลิตโอลิโกแซคคาไรด์จาก HRH และประเมินศักยภาพของโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตได้ในการส่งเสริมการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์แลคโตบาซิลลัส จากการวิเคราะห์โดย High performance anion exchange chromatography พบว่าแกลบประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส ไซโลส อะราบิโนส และกาแลคโตส ในสัดส่วน 68% 26% 4% และ 2% (w/v) ตามลำดับ โดยพบอะราบิโนไซแลน (AX) ในปริมาณ 11% (w/w) และเมื่อนำไปผ่านการปรับสภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2% (w/v) เป็นเวลา 6 วัน ณ อุณหภูมิห้อง พบว่า AX ในแกลบเพิ่มขึ้นเป็น 18% (w/w) เมื่อนำตัวอย่างมาบ่มร่วมกับเอนไซม์ไซแลนเนสกลุ่ม GH10 ได้แก่ Ultraflo Max (UM10) และ Shearzyme 500L (SZ10) และ GH11 ได้แก่ Pentopan mono BG (BG11) และ Ultraflo L (UL11) ที่อุณหภูมิ 50°C pH 5 พบว่าทั้งสองกลุ่มให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดที่ 24 ชั่วโมง โดยเอนไซม์ที่ให้ปริมาณสูงที่สุดสำหรับกลุ่ม GH10 และ 11 ได้แก่ UM10 (16%) และ UL11 (6%) เมื่อวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลด้วยเทคนิค Thin layer chromatography พบว่าที่ 4 ถึง 24 ชั่วโมง เอนไซม์ทั้งสองกลุ่มสามารถผลิตน้ำตาลไซโลส ไซโลไบโอส และไซโลไตรโอส โดย UM10 สามารถผลิตไซโลไบโอสได้อย่างโดดเด่น นอกจากนี้ยังพบการส่งเสริมการเจริญของเชื้อแลคโตบาซิลลัสเมื่อใช้โอลิโกแซคคาไรด์ดังกล่าวเป็นแหล่งคาร์บอน จากการศึกษาชี้ให้เห็นถึงศักยภาพของ HRH ในการเป็นวัตถุดิบทางเลือกใหม่สำหรับการพัฒนาเป็นสารพรีไบโอติกด้วยเอนไซม์ไซแลนเนสกลุ่ม GH10 และ GH11

คำสำคัญ: แกลบข้าวหอมมะลิ, โอลิโกแซคคาไรด์, ไซแลนเนส GH10, ไซแลนเนส GH11

ABSTRACT

The objectives of this study were to investigate abilities of glycoside hydrolase family 10 (GH10) and 11 (GH11) xylanases on oligosaccharides production from HRH and to evaluate *Lactobacillus* spp. growth enhancement by these oligosaccharides. Monosaccharide profile and content HRH were analyzed using High performance anion exchange chromatograph and described as glucose, xylose, arabinose and galactose 68, 26, 4 and 2% (w/v), respectively. Initial amount of the arabinoxylan (AX) in HRH was 11% (w/w) and subsequently was increased to 18% (w/w) after pretreatment by 2% NaOH for 6 days at ambient temperature. The conversion abilities of GH10 xylanases (Ultraflo Max (UM10) and Shearzyme 500L (SZ10)) and GH11 (Pentopan mono BG (BG11) and Ultraflo L (UL11)) during incubation of the pretreated sample at 50°C and pH 5 during 24 h were investigated. The highest reducing sugar (RS) content was found at 24 h by both GH10 and GH11. UM10 showed the highest RS content at 16% for GH10, while UL11 showed the highest at 6% for GH11. The sugar profiles of the hydrolysates from both enzymes were analyzed using Thin layer chromatography. The results showed that during 4 to 24 h of incubation, all hydrolysates consisted of xylose, xylobiose and xylotriose. However, xylobiose was found to be remarkably produced by UM10. Furthermore, the growth promotions of *Lactobacillus* spp. were observed when using the oligosaccharides as carbon source. This study has suggested the potential of HRH as an alternative source for prebiotic production using GH10 and GH11 xylanases.

Keywords: Hommali rice husk (HRH), oligosaccharide, xylanase GH10, xylanase GH11

บทนำ

ในช่วงหลายปีที่ผ่านมา มีงานวิจัยที่ศึกษาการผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าเพิ่มจากส่วนประกอบของลิกโนเซลลูโลสจาก แกลบ โดยมีการรายงานว่าองค์ประกอบทางเคมีในแกลบมีปริมาณเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสสูงถึง 22% และ 23% ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบการผลิตโอลิโกแซคคาไรด์จากเฮมิเซลลูโลสในวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมอื่น ๆ เช่น กากอ้อย และกากรำ ข้าว เป็นต้น โอลิโกแซคคาไรด์ชนิดไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ (XOS) เป็นน้ำตาลที่ประกอบด้วย น้ำตาลไซโลส 2-10 หน่วย ซึ่งอาจมีกิ่ง เป็นน้ำตาลอะราบินโนสมาเกาะที่โมเลกุลของสายโซ่หลักน้ำตาลไซโลส ซึ่งจะเรียกโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดนี้ว่า อะราบินโนไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ (AXOS) นอกจากนี้ยังพบว่าคุณสมบัติของโอลิโกแซคคาไรด์ทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นน้ำตาลที่ไม่สามารถถูกย่อยได้ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ และสามารถส่งเสริมการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โปรไบโอติก ซึ่งมีประโยชน์ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ได้อีกด้วย ดังนั้น XOS และ AXOS สามารถใช้เป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญให้กับจุลินทรีย์โปรไบโอติกได้ โดยเฉพาะในกลุ่มของ *Lactobacilli* และ *Bifidobacteria* (Gibson and Rastall, 2006)

ผนังเซลล์พืชมีโครงสร้างที่ซับซ้อนและทนทานต่อการย่อยสลาย ดังนั้นในการผลิต XOS และ AXOS จากวัสดุชีวมวล จึงมักจะดำเนินการในสองขั้นตอนคือ ขั้นตอนแรกการพรีทรีทเมนต์หรือการปรับสภาพด้วยต่าง เป็นการปรับสภาพของลิกโนเซลลูโลสให้คลายพันธะออกจากกัน ส่งผลทำให้เกิดการพองตัวของเซลลูโลส ลิกนินบางส่วนถูกเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง ทำให้มีโครงสร้างที่เหมาะสมต่อการย่อยสลาย และขั้นตอนที่สองคือการย่อยด้วยเอนไซม์ (Akpınar et al., 2007) มักนิยมใช้เอนไซม์ เอนโดไซแลนเนสซึ่งทำหน้าที่ตัดพันธะ 1,4-glycosidic ในสายหลักของไซแลนหรืออะราบินโนไซแลน ส่วนใหญ่นิยมใช้เอนไซม์ glycoside hydrolase (GH) กลุ่ม 10 หรือ 11 โดยมีรายงานว่า GH10 จะให้ผลิตภัณฑ์อะราบินโนสแทนไซโลส 1 ไซต์ย่อย

ในขณะที่ GH 11 มีอะราบินโนสแทนที่ 2 ไฮดร็อกซิล (Maslen et al., 2007) จากเหตุผลข้างต้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะศึกษาผลของ เอนไซม์ทั้งสองกลุ่มต่อการผลิตโอลิโกแซคคาไรด์จาก HRH

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมตัวอย่างเกลบและการพรีทรีทเมนต์

นำ HRH จากโรงสีในจังหวัดพิจิตรปริมาณ 100 กรัม แช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2% (w/v) เป็นเวลา 6 วัน จากนั้นนำมาล้างจนค่าพีเอชเป็น 6.0-7.0 แล้วอบที่ 45°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาบดและร่อนผ่านตะแกรง ขนาด 40 mesh จากนั้นนำตัวอย่างบรรจุลงในถุงสุญญากาศและเก็บรักษาที่ -20°C

การวิเคราะห์องค์ประกอบคาร์โบไฮเดรตของ HRH

วิเคราะห์องค์ประกอบคาร์โบไฮเดรตของวัตถุดิบ HRH ก่อนและหลังพรีทรีทเมนต์โดยดัดแปลงวิธีการจาก NERL (Sluiter et al, 2010) ทำโดยผสมตัวอย่างที่เตรียมไว้ข้างต้นปริมาณ 400 มิลลิกรัม กับกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 72% ปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร คนเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเจือจางกรดซัลฟูริกจนมีความเข้มข้น 4% นำสารผสมดังกล่าวมาให้ความร้อนด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ 121°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไฮโดรไลเสตที่ได้มาทำให้เย็นลงและเติมน้ำให้เป็น 100 มิลลิลิตร วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลเพนโตแซนทั้งหมดด้วยวิธี Orcinol-HCl (Dische, 1962) โดยใช้น้ำตาลไซโลสเป็นสารมาตรฐาน สำหรับการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (Chapla et al., 2012) (Miller, 1959) ทำโดยปรับตัวอย่างให้มีค่า pH อยู่ในช่วง 5.0-6.0 ด้วยแบเรียมคาร์บอเนต จากนั้นนำมาวิเคราะห์โดย High performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD) โดยใช้ Dionex CarboPac PA-1 column (250 mm x 4 mm) และ guard column (50 mm x 4 mm) อัตราการไหล 1.0 mL/min มีการควบคุม post column ให้มีอัตราการไหลของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ความเข้มข้น 300 mM 0.5 mL/min คำนวณหาปริมาณน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวแต่ละชนิดโดยใช้น้ำตาลกลูโคส ไซโลส อะราบินโนส และกาแลคโตส เป็นสารมาตรฐาน และคำนวณหาอัตราส่วนระหว่างอะราบินโนสต่อไซโลส และปริมาณอะราบินโนสต่อไซโลส (Courtin et al, 2006)

การย่อย HRH โดยเอนไซม์และการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์น้ำตาลเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพ

นำ HRH ที่ผ่านการพรีทรีทเมนต์ดังกล่าวข้างต้นไปย่อยโดยเอนไซม์ เอนไซม์ที่เลือกใช้ได้แก่ เอนไซม์ไซแลนเนสทางการค้า (Novozyme Co. Ltd., Denmark) ในกลุ่ม GH10 ได้แก่ Ultraflo max (UM10) และ Shearzyme (SZ10) และ GH11 ได้แก่ Ultraflo L (UL11) และ Pentopan mono BG (BG11) เริ่มจากเตรียมสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 100 mM ปรับค่า pH ให้เป็น 6.0 แล้วเติมตัวอย่าง HRH ที่ผ่านการพรีทรีทเมนต์ลงในสารละลายบัฟเฟอร์ ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเติมเอนไซม์แต่ละชนิดลงในตัวอย่างที่ความเข้มข้น 133U และนำไปบ่มที่ 50°C เขย่าที่ความเร็วรอบ 170 rpm เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ทำการยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยการนำตัวอย่างไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไฮโดรไลเสตที่ได้จากกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์นี้มาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS) (Miller, 1959) โดยใช้น้ำตาลไซโลสเป็นสารมาตรฐาน ส่วนการวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลที่ย่อยได้ ทำโดยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC) (Chapla et al, 2012) โดยใช้ซิลิกาเป็นเฟสคงที่ (แผ่นอลูมิเนียม 20x20 cm) (Merck) ส่วนเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้สารละลายผสมระหว่าง บิวทานอล : กรดอะซิติก : น้ำกลั่น ในอัตราส่วน 2 : 1 : 1 แสดงผลโดย ฉีดพ่นด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 10% และออกซิเจนความเข้มข้น 0.2% ในเอทานอล และให้ความร้อนที่ 110°C โดยใช้น้ำตาลไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ (XOS; X₁-X₄) เป็นสารมาตรฐาน

การวิเคราะห์การส่งเสริมการเจริญของเชื้อแลคโตบาซิลลัส

นำตัวอย่างมาทดสอบการส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อแลคโตบาซิลลัส 2 สปีชีส์ ได้แก่ *Lactobacillus brevis* TISTR860 และ *Lactobacillus plantarum* JCM1149T (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย)

เตรียมเชื้อแลคโตบาซิลลัสโดยกระตุ้นการเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อ De Man Rogosa and Sharpe (MRS, Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) ที่ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง และเจือจางจนได้ปริมาณ 10^8 cfu/ml ถ่ายเชื้อดังกล่าวที่ความเข้มข้น 1% (v/v) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ modified MRS ที่ไม่มีน้ำตาลเป็นส่วนประกอบ โดยเติมไฮโดรไลสทดแทนน้ำตาลดังกล่าวให้ได้ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวิซ์เท่ากับ 1% (w/v) ทำการบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 0-24 ชั่วโมง โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 630 nm ทุก 2 ชั่วโมง จากนั้นนำค่าที่ได้มาวิเคราะห์อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) และเปรียบเทียบผลการทดลองกับตัวอย่างเชื้อที่บ่มใน MRS ที่มีน้ำตาลเดกซ์โตรส 2 % และ modified MRS ที่ไม่มีน้ำตาลหรือไฮโดรไลสเป็นส่วนประกอบ

ผลการทดลองและวิจารณ์

องค์ประกอบน้ำตาลใน HRH

เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบคาร์โบไฮเดรตโดย HPAEC-PAD พบว่า HRH ก่อนการพรีทริทเมนต์ประกอบด้วยน้ำตาลอะราบินอส ไซโลส กลูโคส และกาแลคโตส ในสัดส่วน 3.61% 26.38% 68.18% และ 1.83% ตามลำดับ ในขณะที่ตัวอย่างหลังการพรีทริทเมนต์พบน้ำตาลดังกล่าวเป็น 3.87% 29.03% 65.56% และ 1.54% (w/v) ตามลำดับ (Table 1) แสดงให้เห็นว่าการพรีทริทเมนต์ (P-HRH) สามารถลดสัดส่วนของน้ำตาลกลูโคส และเพิ่มสัดส่วนของน้ำตาลไซโลส นอกจากนี้ยังพบว่าอะราบินอสของ HRH มีปริมาณเพิ่มขึ้น 7% หลังการพรีทริทเมนต์อีกด้วย เนื่องจากการพรีทริทเมนต์เป็นการกำจัดสารแทรกที่อยู่บนผนังเซลล์ ได้แก่ โปรตีน ไขมัน และสารประกอบอนินทรีย์ เป็นต้น (Kim, 2013) จึงทำให้ปริมาณคาร์โบไฮเดรตเพิ่มมากขึ้น

องค์ประกอบน้ำตาลและผลผลิตของ HRH จากกระบวนการที่แตกต่างกัน

การพรีทริทเมนต์ทำให้ปริมาณผลผลิตลดลง 32% (ตารางที่ 2) แสดงให้เห็นว่าการพรีทริทเมนต์ด้วยต่างอาจมีผลต่อการสลายพันธะไฮโดรเจนในผนังเซลล์ของพืช ทำให้เกิดการบวมของเฮมิเซลลูโลส และพันธะที่ยึดเหนี่ยวเซลลูโลสถูกทำลายเนื่องจากโปรตีนและลิกนินที่ประกอบในผนังเซลล์พืชจะยึดกันอยู่ในพันธะเหล่านี้ การพรีทริทเมนต์จึงสามารถกำจัดสารดังกล่าวออกไปได้ (Gary et al., 2011) เห็นได้ว่าการพรีทริทเมนต์ด้วยต่างทำให้อัตราส่วนของน้ำตาลไซโลสเพิ่มขึ้นจาก 26.4% เป็น 29.0% ในขณะที่ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเพิ่มขึ้นจาก 19.9% เป็น 28.0% อีกทั้งยังทำให้ปริมาณ AX เพิ่มขึ้นจาก 11.5% เป็น 18.6% (ตารางที่ 1)

ชนิดและปริมาณน้ำตาลของผลิตภัณฑ์หลังจากการย่อยโดยเอนไซม์

เนื่องจากเอนไซม์ไซแลนเนสกลุ่ม GH10 และ GH11 สามารถย่อยพอลิแซคคาไรด์ที่ตำแหน่งพันธะ β -1,4 glycosidic จึงทำให้เอนไซม์ทั้งสองกลุ่มสามารถผลิตโอลิโกแซคคาไรด์ได้ เมื่อศึกษาเปรียบเทียบความสามารถของเอนไซม์ไซแลนเนสกลุ่ม GH10 ได้แก่ Ultraflo max (UM10) และ Shearzyme (SZ10) และ GH11 ได้แก่ Ultraflo L (UL11) และ Pentopan mono BG (BG11) ในการย่อยถูกเติมลงในตัวอย่าง P-HRH ที่ 50°C เป็นเวลา 0-24 ชั่วโมง พบว่าเอนไซม์ทั้งสองชนิดให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวิซ์สูงขึ้นตามระยะเวลาการบ่ม โดยที่ 24 ชั่วโมง UM10 ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวิซ์ 16% ซึ่งเป็นค่าสูงที่สุดในกลุ่ม GH10 ในขณะที่ UL11 ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวิซ์ 6% เป็นค่าสูงที่สุดในกลุ่ม GH11

อย่างไรก็ตามเมื่อวิเคราะห์ชนิดของผลิตภัณฑ์น้ำตาลในไฮโดรไลสจากเอนไซม์ทั้งสองชนิดโดยวิธี TLC พบว่าทั้ง UM10 และ UL11 สามารถผลิตไซโลส ไซโลไบโอส และไซโลไตรโอส (รูปภาพที่ 3A) ในขณะที่ UL11 สามารถผลิตไซโลไบโอส และไซโลไตรโอส ได้เท่านั้น และเมื่อเพิ่มเวลาในการทำปฏิกิริยาพบว่าแถบของโอลิโกแซคคาไรด์แต่ละชนิดมีสีที่เข้มขึ้น แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ทั้งสองชนิดสามารถผลิตโอลิโกแซคคาไรด์ได้มากขึ้น (รูปภาพที่ 3A) จากผลการทดลองใน Table 1 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า UM10 ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวิซ์สูงกว่า UL11 ถึง 10% นั้นอาจจะเป็นเพราะมีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว คือน้ำตาลไซโลสเจือปนอยู่ ร่วมกับน้ำตาลไซโลไบโอสที่มีปริมาณที่โดดเด่น และไซโลไตรโอส ซึ่งน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เจือปนอยู่นี้ อาจจะทำให้เกิดการส่งเสริมการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้ (Coppa, 2006) ในขณะที่ UL11 สามารถผลิตไซโลไบโอส

ได้โดดเด่นน้อยกว่า แต่มีความน่าสนใจที่เอนไซม์ชนิดนี้ไม่ผลิตไซโลสจึงไม่จำเป็นต้องนำไปผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกไฮโดรไลสจาก UL11 ไปวิเคราะห์ความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลคโตบาซิลลัสต่อไป

การส่งเสริมการเจริญของเชื้อแลคโตบาซิลลัส

ผลจากการวิเคราะห์การเจริญเติบโตของเชื้อ *L. brevis* และ *L. plantarum* เมื่อบ่มเชื้อใน modified MRS ที่เติมไฮโดรไลสจากเอนไซม์ UL11 ที่ระดับน้ำตาลรีดิวซ์ความเข้มข้น 1% ที่ 37°C เป็นเวลา 0-24 ชั่วโมง พบว่าเชื้อแลคโตบาซิลลัสทั้งสองสปีชีส์สามารถใช้โอลิโกแซคคาไรด์ที่อยู่ในไฮโดรไลสเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนน้ำตาลเด็กซ์โทรสได้ (Figure 4) เมื่อเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีน้ำตาลและอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลเด็กซ์โทรส 2% เมื่อนำค่าความขุ่นมาวิเคราะห์อัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อทั้งสองชนิดมีค่าเท่ากับ 1.6 และ 1.7 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเชื้อแลคโตบาซิลลัสสามารถใช้โอลิโกแซคคาไรด์ในการเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อแลคโตบาซิลลัสสามารถผลิตเอนไซม์ xylose isomerase ทำให้สามารถย่อยโอลิโกแซคคาไรด์ให้เป็น xylose แล้วเปลี่ยนไปเป็น xylulose-5-phosphate จากนั้นน้ำตาลชนิดนี้จะเข้าสู่วิถี pentose phosphate และ phosphoketolase ทำให้ได้น้ำตาล fructose-6-phosphate 2 ตัวและ Glycerinaldehyde-3-phosphate 3 ตัว น้ำตาลเหล่านี้จะเข้าสู่วิถีไกลโคไลติกและวัฏจักรเครปส์เพื่อนำไปผลิตเป็นพลังงานให้แก่เซลล์ต่อไป (Stumpf and Horecker, 1955)

สรุป

เอนไซม์ไซแลนเนสกลุ่ม GH10 และ GH11 สามารถผลิตโอลิโกแซคคาไรด์จาก HRH ได้ และมีปริมาณน้ำตาลเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มเวลาในการทำปฏิกิริยา โดยเอนไซม์แต่ละชนิดเมื่อศึกษาที่ pH 6 อุณหภูมิ 50°C พบว่ามีความสามารถในการผลิตโอลิโกแซคคาไรด์แตกต่างกัน โดย UM10 และ UL11 ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุดในกลุ่ม GH10 และ GH11 ตามลำดับ ส่วนชนิดของน้ำตาลที่ได้จาก UM10 ได้แก่ ไซโลส ไซโลไบโอส และไซโลไตรโอส ในขณะที่น้ำตาลที่ได้จาก UL11 ได้แก่ ไซโลไบโอส และไซโลไตรโอส ดังนั้นเอนไซม์ชนิด UL11 เหมาะสมต่อการนำมาส่งเสริมการเจริญของเชื้อ *L. brevis* และ *L. plantarum* เนื่องจากสามารถผลิตโอลิโกแซคคาไรด์ได้และมีความบริสุทธิ์สูง และเมื่อนำมาทดสอบส่งเสริมการเจริญของเชื้อแลคโตบาซิลลัสทดแทนการใช้น้ำตาลเด็กซ์โทรส พบว่าโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตได้สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อแลคโตบาซิลลัสได้อย่างโดดเด่น

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินมหาวิทยาลัยนเรศวร ประจำปี 2560 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ ที่นี้

เอกสารอ้างอิง

- Akpinar, O., Ak, O., Kavas, A., Bakir, U and Yilmaz, L. 2007. Enzymatic production of xylooligosaccharides from cotton stalk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55: 5544-5551.
- Brodeur, G., Yau, E., Badal, K., Collier, J., Ramachandran, K. B. and Ramakrishnan, S. 2011. Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: a review. *Enzyme research*. 2011: doi:10.4061/2011/787532.
- Chapla, D., Pandit, P. and Shah, A. 2012. Production of xylooligosaccharides from corn cob xylan by fungal xylanase and their utilization by probiotics. *Bioresource Technology*. 115, 215-221.

- Dodd D and Cann I K O. 2009. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. *Global Change Biology Bioenergy*. 1: 2–17.
- Gibson GR, Rastall RA and editors. 2006. *Prebiotics: Development and Application*. Chichester college, Chichester. 57-100
- Kim, J. S., Lee, Y. Y. and Kim, T. H. 2016. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. 199: 42-48.
- Li, Y., R. Ruan., PL Chen., Z. Liu., X. Pan and X. Lin. 2004. Enzymatic hydrolysis of corn stover pretreated by combined dilute alkaline treatment and homogenization. *Trans. ASAE*. 47: 821-5.
- Millett, M. A.; Baker, A. J. and Satter, L. D. 1976. Physical and Chemical Pretreatments for Enhancing Cellulose Saccharification. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*. 6: 125-153.
- R.L. Whistler and M.L. Wolfrom (Eds.). 1962. *Methods in Carbohydrate Chemistry*. Academic Press, New York. 1: 477-512
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., and Crocker, D. 2010. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. *Laboratory analytical procedure*. 510-42618.
- Stumpf, P. K., and Horecker, B. L. 1956. The role of xylulose 5-phosphate in xylose metabolism of *Lactobacillus pentosus*. *J Biol Chem*. 218(2): 753-768.
- Swennen, K.; Courtin, C.M.; Lindemans, G. C. J. E. and Delcour, J. A. 2006. Large-scale production and characterization of wheat bran arabinoxyloligosaccharides. *J. Sci. Food Agric*. 86: 1722–1731.

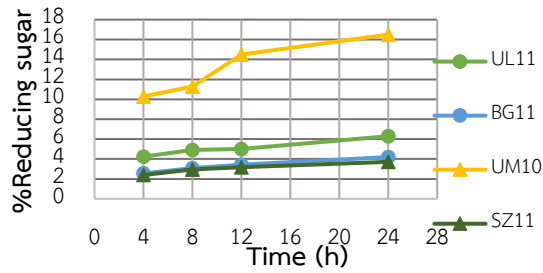


Figure 1 Enzymatic production of oligosaccharide from pretreated RH using GH10 and GH11 endoxylanases.

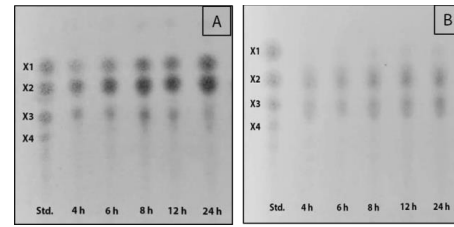


Figure 2 TLC chromatogram of enzymatic hydrolysates of alkali pretreated RH (A) by UM10 and (B) UL11 (133 U, 50°C, 4 h). Xylose, mixture of xylose, xylobiose, xylotriose and xylotetraose were used as standard.

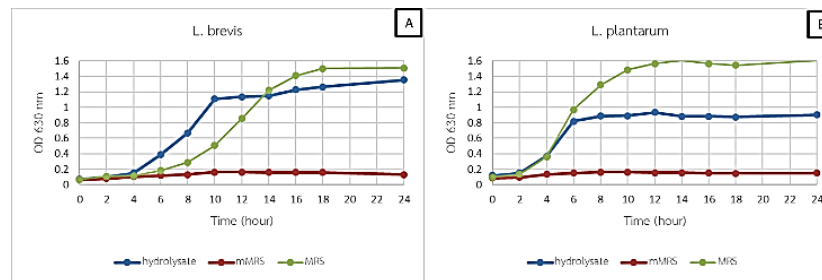


Figure 3 Growth characteristics of *L. brevis* (A) and *L. plantarum* (B) cultured in commercial MRS, modified MRS and modified MRS with hydrolysate 1% at 37°C for 0-24 h.

Table 1 Monosaccharides analysis results of biomass obtained by untreated and alkali pretreatment from Hommali rice husk as % w/v.

| sample | % monosaccharides (w/w) | | | | A/X | AX (%) | yield (%w/w) | Total sugar (%w/w) |
|--------|-------------------------|-------|-------|------|------|--------|--------------|--------------------|
| | Ara | Xyl | Glu | Gal | | | | |
| HRH | 3.61 | 26.38 | 68.18 | 1.83 | 0.14 | 11.5 | 100±0.00 | 19.89±0.57 |
| P-HRH | 3.87 | 29.03 | 65.56 | 1.54 | 0.13 | 18.6 | 68.74±0.68 | 28.00±0.89 |

HRH is Hommali-rice husk and P-RH is Pretreatmented Hommali-rice husk